

子宮頸部癌細胞(HeLa cell)에서 乳香의 細胞枯死 機轉 研究

圓光大學校 韓醫科大學 婦人科學教室
박경미, 공복철, 이수정, 최창민, 유심근

ABSTRACT

Olibanum-induced Apoptosis Signaling in Human Cervical Carcinoma HeLa Cells

Kyung-Mi Park, Bok-Cheul Kong, Su-Jung Lee,
Chang-Min Choe, Sim-Keun Yoo

Dept. of gynecology, College of Oriental Medicine, Won-Kwang University

Purpose : To address the ability of Olibanum to induce cell death, we investigated the effect of olibanum on cell apoptosis. Twenty-four hours later, apoptosis occurred following olibanum exposure in a dose-dependent manner.

Methods : We culture HeLa cell which is human metrocarcinoma cell in D-MEM included 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories) below 37°C, 5% CO₂. Then we observed apoptosis of log phase cell which is changed cultivation liquid 24 Hours periodically.

Results : The treatment of BAPTA-AM regulated *olibanum*-induced apoptosis in HeLa human cervical carcinoma cells. The 24 hr-earlier -thapsigargin-pretreated cell showed the resistance against *olibanum*-induced apoptosis and the Ru360-mitochondrial uniporter-inhibited *olibanum*-induced apoptosis, too. It means that *olibanum* leads to the accumulation of calcium and the resultant apoptosis in HeLa cells. Immunoblotting data also shows that the expression of GRP78, ER stress marker protein, was induced by the *olibanum*. Bcl-2, anti-apototic protein, was decreased and that the expression of Bax, pro-apototic protein, was increased by the addition of *olibanum*. Interestingly, the *olibanum* increased the activity of caspase-8 as well as calpain cysteine protease in HeLa cervical carcinoma cells. Calpain inhibitor-calpastatin as well as caspase-8C/A expression abrogated *olibanum*-induced apoptosis in the carcinoma cells. The inhibition of caspase-8 regulated *olibanum*-induced calpain activation but the inhibition of calpain did not have any effect on the caspase-8 activation in HeLa human cervical carcinoma cells.

Conclusion : We conclude that *olibanum* induces the accumulation of calcium and the resultant apoptosis in which caspase-8 and calpain are involved.

Key Words: Olibanum, Bax, apoptosis, GRP78, calpain, caspase, HeLa cells

I. 緒 論

子宮頸部癌은 女性의 生殖器에 發生하는 惡性腫瘍 중 가장 흔한 疾患이다. 이 疾患은 약 10여년의 長期間에 걸친 前癌性 병변 즉 上皮內癌의 단계를 거쳐 浸潤性 癌으로 進行하는 과정을 거치므로 최근에는 早期診斷과 治療가 시행되면서 上皮內 腫瘍은 增加 추세에 있지만 浸潤性 癌은 減少 추세에 있다¹⁻⁶⁾.

子宮頸部癌의 임상증상은 주로 輕微한 陰出血인데 특징적으로 性交 후 혹은 閉經 후에 발생하며 病이 進行될수록 出血과 分泌가 甚해지고 潰瘍이 深化되고 2次 感染을 招來할 시 惡臭를 發散하고, 주위 臟器를 侵犯하면 尿路症狀, 直腸不快感, 骨盤痛, 腰痛, 淋巴浮腫, 尿管閉鎖증상이 나타난다^{4,6)}.

子宮頸部癌은 한의학의 ‘崩漏’, ‘五色帶下’, ‘積聚’, ‘癥瘕’, ‘血蠱’등의 範疇에 속하며^{4,5)}, 腫塊性을 고려할 때 ‘積聚’, ‘癥瘕’, ‘血蠱’가 더욱 유사하다고 할 수 있다. 이 중 癥瘕는 女性의 生殖器에 好發하는 腫塊로서, 西洋醫學의 子宮頸部癌, 子宮筋腫, 卵巢囊腫, 卵管癌, 卵巢癌, 絨毛上皮癌, 骨盤 炎症性腫塊 등이 包含된다^{7,8)}.

癥瘕의 發病에는 外感寒邪, 七情所傷, 正氣虛, 傷食, 瘀血, 痰濕 등이 原因이 되어 胞中の 血行이 妨害를 받아 血瘀 狀態가 誘發되어 硬塊를 形成하는 것으로 理解하고 있었음을 알 수 있으며, 治療法은 病因病期에 따라 各各 다르지만 대체적으로 “養正則邪自除”의 原則下에 發病原因에 따라 活血, 理氣, 導滯, 消痰의 治法을 使用하였다^{6,9)}.

乳香은 活血止痛, 通氣化滯, 消腫生

肌 등의 效能이 있고 香烈走竄하는 性向이 있어 氣血凝滯, 心腹疼痛, 癰瘡腫毒, 跌打損傷, 癥塊痞積 등에 활용하여 왔고¹⁰⁻¹²⁾, 최근에는 乳香의 造骨細胞의 활성화¹³⁾나 抗癌作用¹⁴⁾에 대한 연구가 이루어지고 있다.

본 연구는 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell을 이용하여 乳香에 의한 細胞枯死 유발 및 이에 관련된 칼슘의 관련성과 endoplasmic reticulum (ER)에서 GRP78의 발현 및 mitochondria와 관련된 Bcl-2와 Bax의 발현양상 그리고 caspase의 활성화와 calpain과의 관계 등을 觀察한 결과, 乳香이 HeLa cell에 미치는 抗癌機轉과 信號傳達機轉에 관한 知見를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材 料

1) 藥材

實驗에 사용된 乳香은 圓光大學校 附屬益山韓方病院에서 구입한 것을 精選하여 使用하였다.

2) 試藥

Anti-Bcl-2, Bax or Bak antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 공급받았다. Calphostine C와 BAPTA-AM, Ru-360 및 Thapsigargin은 Calbiochem에서 구입하였으며 Hoechst 33258 dye는 Sigma(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 세포배양 시 필요한 배양액 및 시약들은 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다.

3) 檢液의 製造

乳香 400 g에 증류수 4760 cc를 가하여 3시간 동안 電熱器로 煎湯한 후 1540 cc를 抽出하여 3,000 rpm에서 20분간 遠心分離하고 진공농축기로 減壓, 濃縮한 후 凍結乾燥器에서 凍結乾燥하여 10%의 收率로 建造物 154 g을 製造하였다. 이 건조물에 滅균된 蒸溜水를 첨가하여 溶解物을 만들어 실험에 사용하였다.

2. 方法

1) 細胞柱 培養

사람 子宮頸部癌 細胞柱인 HeLa 세포를 37°C, 5% CO₂ 하에서 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories)이 포함된 D-MEM에서 培養하며 약 24시간 주기로 培養液을 교체하여 주며 log phase에 있는 세포에 乳香을 처리하여 細胞 枯死 현상을 관찰하였다.

2) Apoptosis 測定

HeLa cell (1×10^5 cells)을 6 cm dish에 배양하였다. 핵의 染色을 위하여 乳香을 24시간 처리한 HeLa cell군과 시약처치를 하지 않은 HeLa cell을 trypsin처리하여 분리한 다음 100% methanol로 고정하였다. PBS로 3번 washing한 후, Hoechst 33258 dye로 염색하여 핵의 분절, 응축 등이 일어난 세포를 apoptosis가 일어난 세포로 간주하였다. 형광 현미경(Nikon, Tokyo)으로 관찰 현상하였다.

3) Caspase 및 calpain protease 活性度 測定

HeLa cell (2×10^6 cells)을 4 °C에서 15 분 동안 lysing buffer (1%

TritonX-100, 0.32 M sucrose, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM dithiothreitol (DTT), 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)에서 溶解하고 20,000 g로 15분 동안 遠心分離시켰다. 遠心分離하여 얻은 上層液은 BCA (Bicichonic acid, Sigma, St. Louis)방법으로 定量하여 assay buffer (100 mM Hepes, 10% sucrose, 0.1% chaps, pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin, 2 mM DTT)에 희석된 형광 표지된 기질과 37°C에서 30분간 反應시킨 후, fluorometer로 측정하였다. 이 때의 파장은 caspase-3와 calpain의 경우 excitation wavelength (380 nm)와 emission wavelength (460 nm)를 사용하였다. Caspase-8과 caspase-9의 경우, excitation (400 nm) 와 emission(505 nm)wave length을 사용하였다. 기질은 caspase-3 cysteine protease의 경우, fluorogenic substrate인 7-amino-4-coumarin AMC-DEVD (200 µM), caspase-8과 -9은 각각 AFC-VEID, AFC-LEHD (각각 200 µM)를 사용하였으며 calpain의 경우는 fluorogenic substrate인 AMC-LLVY (160 µM) 를 사용하였다. 상기 protease 활성도는 기질의 proteolytic cleavage를 측정함으로써 인지하였다.

4) Western blotting

HeLa cell (5×10^6)를 0.5 ml lysis buffer 용액에 넣은 다음 단백질 양은 BCA protein assay 법으로 定量하였다. 定量한 단백질은 sample buffer에서 denaturation 시킨 다음 SDS-PAGE를

이용하여 전기영동을 하였다. 전기영동 후 gel을 nitrocellulose membrane으로 transfer 시킨 다음 항체를 결합시킨 후 peroxidase가 conjugation된 2차 항체와 결합시킨 후 luminescence를 이용하여 develop 시켰다.

5) 結果算出

표시된 結果는 3번 以上の 獨立의인 結果이며 이들의 平均(mean)과 標準偏差 (standard deviation, SD)를 算出하여 結果를 표시하였다. 細胞毒성을 보이는 값의 比較에 있어서는 students's t-test 를 使用하였으며 $P < 0.01$, 혹은 $P < 0.05$ 수준으로 有意성을 검증하였다.

Ⅲ. 實驗 結果

1. 乳香으로 인한 HeLa cell의 細胞枯死 및 칼슘의 관련성

乳香으로 인한 抗癌效果를 검색하기 위해 子宮癌 細胞柱인 HeLa cell에 乳香을 처리하여 세포죽음을 야기하는지 여부를 알아보았다. 乳香 (0, 0.5, 1 혹은 2 mg/ml)을 처리 시, 용량 의존적으로 細胞枯死가 야기됨을 확인하였다 (Fig. 1A).

乳香으로 인한 HeLa cell의 細胞枯死에서 칼슘의 役割을 알아보기 위하여 細胞透過性이 있는 calcium chelator인 BAPTA-AM을 處理하고 그 影響을 살펴 보았다. 乳香 2 mg/ml을 處置하고 HeLa cell의 細胞枯死를 誘導하는 條件에서 BAPTA-AM 5 μ M를 처치하여 세포내 증가하는 칼슘을 억제하였을 때, 세포의 죽음에 대하여 有意性있는 保護效果를 나타내었다. 반면에 細胞에 透過性이 없는 동일 chemical인 BAPTA는

전혀 保護效果를 나타내지 못함을 알 수 있었다. 위 결과로부터 乳香으로 인한 칼슘의 양적 증가가 細胞枯死의 주요한 원인임을 알 수 있다(Fig. 1B).

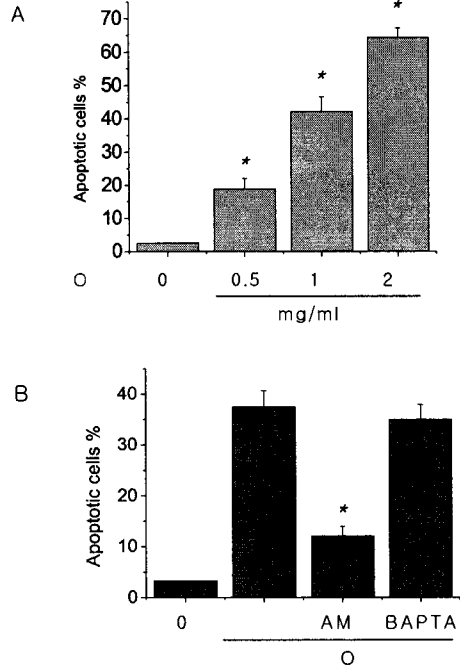


Fig.1. *Olibanum* induces apoptosis in HeLa cells. (A). Cell apoptosis was assessed by Hoechst staining methods. HeLa cells were incubated with 0.5, 1 or 2 mg/ml *Olibanum* for 24 hrs. (B) Cells were treated with 5 μ M BAPTA-AM or BAPTA in the presence of 2 mg/ml *Olibanum*. Data were the mean \pm S.E. of three experiments. *Significantly different from control, $p < 0.05$. 0: *Olibanum*.

2. 乳香으로 인한 HeLa cell에 대한 毒性에서 세포내 칼슘의 영향

세포내 칼슘 농도의 변화는 細胞枯死를 매개하는 여러 信號傳達 分子의 酵素 活性, 細胞週期の 調節, 細胞 增殖과 分化 등의 다양한 세포 기능을 變化시킨다^{15,16}.

세포내 칼슘 저장고인 ER의

Ca-ATPase의 억제제인 thapsigargin을 소량 전처리 (0.5, 1, 2, 5 혹은 10 nM) 하고 24시간 방치하여 ER의 칼슘을 고갈시켰다. 자체 독성도 있지만 2 mg/ml의 乳香 처치군은 56.78%의 죽음을 보이는 데 비하여 평균적으로 25% 가량의 보호효과를 나타내었다(Fig 2A).

또한 乳香으로 인해 증가된 세포내 칼슘이 mitochondria로 섭취됨으로써 mitochondria내의 칼슘이 증가되어 細胞枯死로 연결되어질 수 있으므로 mitochondria의 칼슘 uniporter억제제인 Ru360을 10 혹은 20 uM을 처리하여 mitochondria의 칼슘 증가를 억제하였다. 그 결과 유향으로 인한 細胞枯死이 有意性있게 보호됨을 알 수 있었다(Fig 2B). 유향 1mg/ml 역시 동일한 결과를 나타내었다.

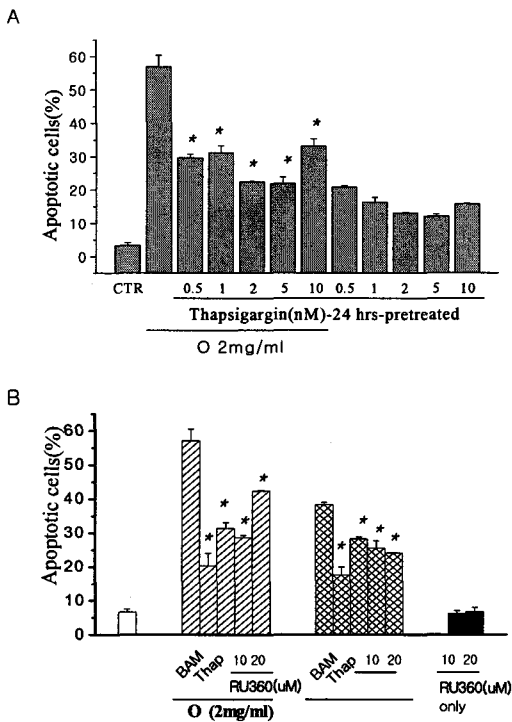


Fig. 2. Calcium is a key factor in *olibanum*-induced apoptosis. (A) Cells

were treated with various concentrations of thapsigargin (0, 0.5, 1, 2, 5 or 10 nM) for 24 hrs. And then the cells were washed with 10% FBS-contained DMEM. The cells were incubated with *olibanum* (2 mg/ml) for 24 hrs. (B) Cells were treated with 10 or 20 uM Ru-360 and then exposed to 1 or 2 mg/ml *olibanum*. In parallel, the cells were 24 hrs-pretreated with 10 nM Thapsigargin or treated with 5 uM BAPTA-AM and the cells were exposed to 1 or 2 mg/ml *olibanum* for 24 hrs. *Significantly different from *Olibanum*-treated p < 0.05. 0: *Olibanum*.

3. 乳香으로 인한 ER stress marker protein인 GRP78과 Bcl-2와 Bax의 발현 Stress가 ER내에서 이루어질 때, ER stress 단백질인 GRP78과 GRP94와 같은 단백질의 발현이 증가한다¹⁷⁾.

細胞枯死을 유발하는 농도인 1mg/ml의 乳香 처치 시, 12, 24, 혹은 36시간 이후 GRP78 발현의 증가를 알 수 있었다. 그러나 乳香 처치 후, 48시간 이후 GRP78의 발현이 감소함을 알 수 있었다. 이런 결과는 stress에 적응하고자 하는 특성을 가진 GRP78의 발현이 stress 지속 시간이 길어짐에 따라 감소함을 나타낸다.

한편 mitochondria와 연관되어진 細胞枯死에 대한 직접적인 역할을 한다고 알려진 Bcl-2, Bax 단백질은 양적 차이를 보여주었다. Bcl-2는 세포를 보호한다고 알려진 단백질이며 Bax는 pro-apoptotic 단백질로 알려져 있다. Bcl-2의 감소와 Bax의 증가를 확인하였다 (Fig. 3A). 또한 GRP78 발현은 乳香의 농도 의존적으로 증가하였다(Fig 3B).

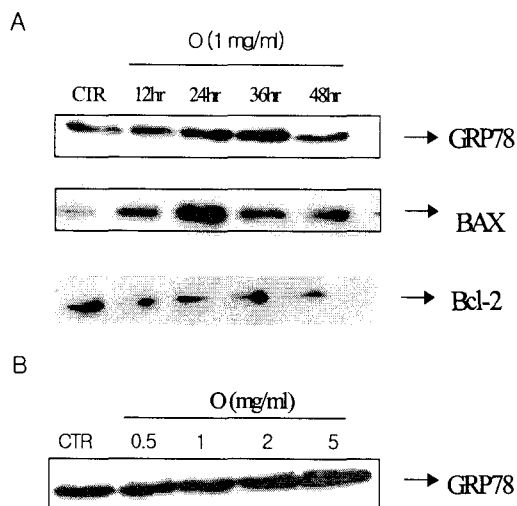


Fig. 3. *Olibanum* regulates the expressions of GRP78, Bcl-2 and Bax in HeLa cells. (A) HeLa cells were subjected to 1 mg/ml *olibanum* for 0, 12, 24, 36 and 48 hrs. The cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. GRP78, Bcl-2 and Bax were visualized by western blot analysis. (B) The cells were subjected to 0.5, 1, 2 or 5 mg/ml *olibanum* for 24 hrs. And then the cell lysates were prepared and separated on SDS-PAGE and transferred onto a nitrocellulose membrane. GRP78 was visualized by western blot analysis. O: *Olibanum*

4. 乳香으로 인한 caspase 활성

HeLa cell에서 乳香은 농도의존적인 caspase-3의 활성 증가를 보여주었다 (Fig. 4A). 이에 비하여 caspase-8은 비교적 낮은 농도인 0.5 mg/ml의 乳香 처리 시 가장 높은 활성을 보였다. 또한 caspase-9의 활성은 caspase-8 및 3과 비교하여 볼 때 상대적으로 적은 변화를 나타내었으며 낮은 농도에서 비교적 높은 활성을 보였다(Fig. 4B, C).

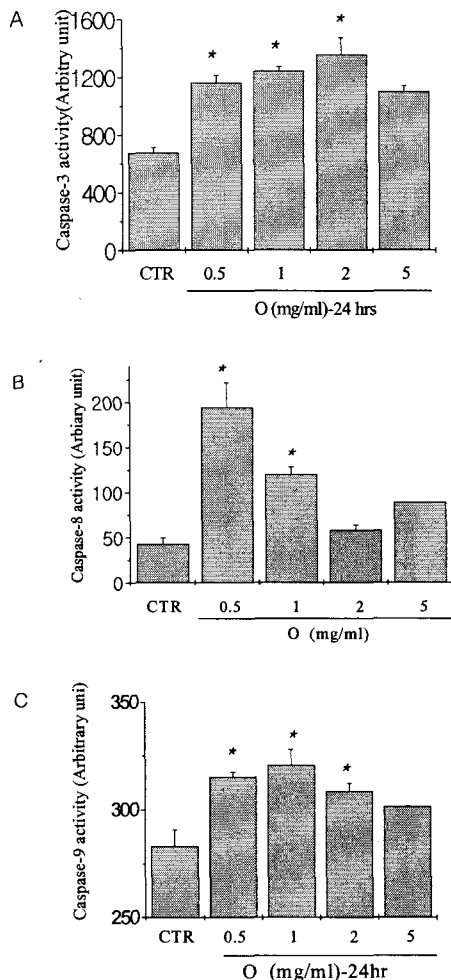


Fig. 4. *Olibanum* induces the activation of caspase 3, 8 or 9 cysteine protease in HeLa cells. Cells were incubated with various concentrations of *Olibanum*(0, 0.5, 1 or 2 mg/ml) for 24 hrs. O: *Olibanum*

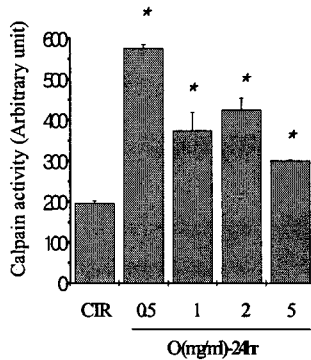
5. 乳香으로 인한 細胞枯死에서 calpain의 役割

細胞枯死시 주된 경로는 caspase-의존적인 경로이며¹⁸⁻²⁰ 최근 caspase-비의존적인 細胞枯死 경로 역시 주목받고 있다²¹⁻²³.

乳香으로 인한 caspase에 대한 연구와 더불어 calpain의 실험을 실시하여

그 연관성을 살펴보고자 하였다. calpain은 protease의 일종으로 caspase-8과 유사하게 비교적 낮은 농도인 0.5 mg/ml과 1mg/ml의 乳香 처리시 活性이 강하게 나타났다. 이로부터 calpain과 caspase-8의 연관을 추정해 볼 수 있다.(Fig. 5A). 또한 caspase의 活性 역시 가장 높게 나타나는 시간대인 24시간에 calpain의 活性이 가장 有意하게 증가함을 보여주었다. Calpain은 48시간대에서는 매우 活性이 억제됨을 보여주었다 (Fig. 5B).

A



B

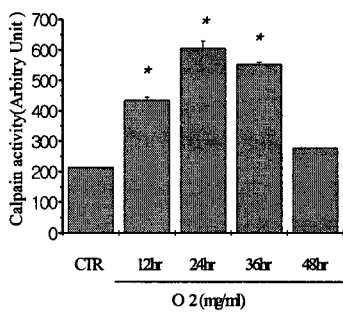


Fig. 5. *Olibanum* induces the activation of calpain in HeLa cells. (A) Cells were incubated with various concentrations of *olibanum* (0, 0.5, 1, 2 or 5 mg/ml) for 24 hrs. (B) Cells were treated with 2 mg/ml *olibanum* for the indicated periods (0, 12, 24, 36 or 48 hrs). O: *Olibanum*

6. 乳香으로 因한 細胞枯死에서 caspase-8과 calpain의 役割

앞서 얻은 결과를 총체적으로 입증하기 위하여 caspase-8과 calpain의 억제가 細胞枯死에 미치는 영향을 알아보았다. Caspase-8의 catalytic mutant로서 효소의 활성을 억제하는 caspase-8C/A를 transfection시 乳香으로 인한 죽음은 有意性있게 보호되었으며 또한 calpain 억제제인 calpastatin을 처리시에 역시 control 수준으로 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6A). 이는 caspase-8과 calpain의 관련을 보다 분명하게 제시하여주는 결과이다. 즉 caspase-8C/A 발현은 calpain을 억제하였으며(Fig. 6B), calpain 억제 시에는 caspase-8의 영향은 보이지 않았다(Fig. 6C). 즉 caspase-8이 calpain을 조절함을 알 수 있었다.

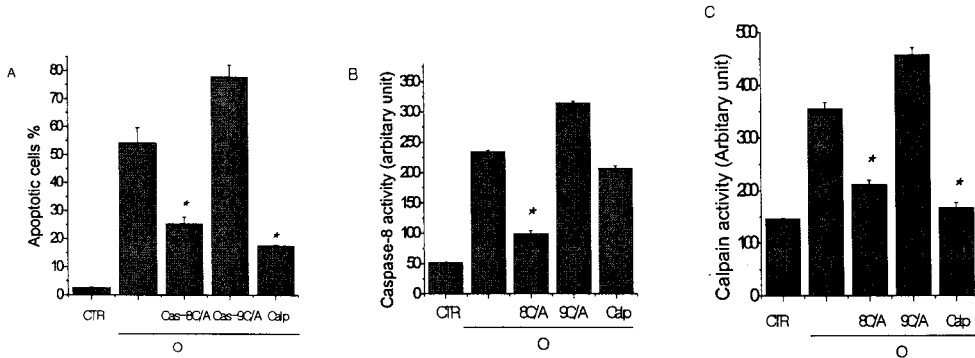


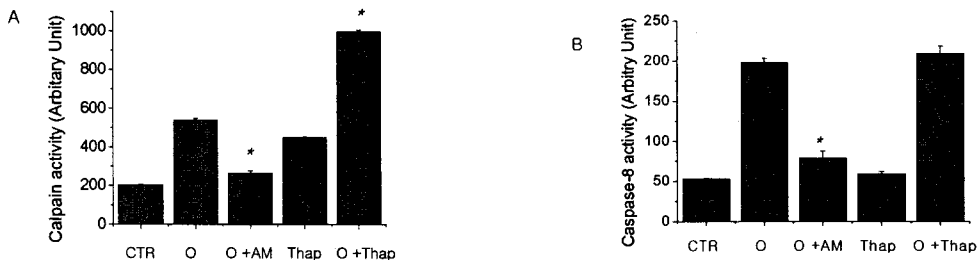
Fig. 6. Caspase 8 regulates *Olibanum*-induced calpain activity and the resultant apoptosis in HeLa cells. Cells were transfected with pcDNA-3, caspase 8 C/A or caspase 9 C/A. And then the cells were incubated with 2 mg/ml *olibanum* for 24 hrs. In parallel, the cells were treated with calpastatin(1 uM) and subsequently with *olibanum*. 24 hrs later, the apoptosis (A), caspase-8 (B) and calpain (C) were assessed as described in Materials and Methods. O: *Olibanum*

7. 乳香으로 인한 細胞枯死에서 caspase-8과 calpain의 活性

乳香 0.5 mg을 처리시 calpain의 증가가 일어났으며 thapsigargin 0.5 uM을 24시간 처리함으로 비슷한 수준의 calpain의 活性 증가가 나타났다. 이 두 가지 약물을 동시 처리시에는 有意性있는 현저한 calpain의 증가가 나타났다. 乳香 1 mg/ml을 처리시에도 역시 동일한 작용이 나타난 것을 알 수 있었다 (Fig. 7A). 이는 calpain의 증가가 乳香으로 인한 죽음의 핵심적인 역할을 하는 것임을 분명히 제시하는 것이다. 이

에 비하여 caspase-8의 경우, 乳香에 의하여서 caspase-8의 活性이 증가되지만 thapsigargin에 의하여서는 변동이 없었다. 동시 처리시에도 별다른 변화가 없었다(Fig. 7B).

이런 결과로부터 소량의 thapsigargin을 전 처리시에는 ER내의 칼슘이 고갈이 되지만, 일정 정도 이상 (1 uM) 처리시에는 오히려 calpain의 증가가 유발되어서 乳香으로 인한 죽음을 보다 강화시킬 수도 있음을 알 수 있었다(Fig. 7C).



C

	CTR	O	AM	Thap	O+Thap
Apoptosis(%)	2.45	39.68	11.56	26.78	81.25

Fig. 7. The co-treatment of thapsigargin increases the apoptosis in *Olibanum*-treated cells. (A) Cells were treated with 5 uM BAPTA-AM, 0.5 uM Thapsigargin and subsequently with 2 mg/ml *olibanum*. 24 hours later, the calpain (A) or caspase-8 activity (B) was assessed. (C) The apoptosis was assessed. O: *Olibanum*

8. 乳香으로 인한 細胞枯死의 經路

본 實驗結果를 종합하여 볼 때, 乳香은 먼저 칼슘을 증가시키며, 이를 통한 calpain과 caspase의 活性이 증가되고 그로 인해서 細胞枯死를 유도함으로 항암제로서의 가능성을 제시하여 주었다 (Fig. 8). 한편 caspase-8의 활성화로 인한 caspase-9의 活性은 calpain의 역할보다는 상대적으로 적게 細胞枯死에 영향을 미쳤을 것임을 알 수 있다.

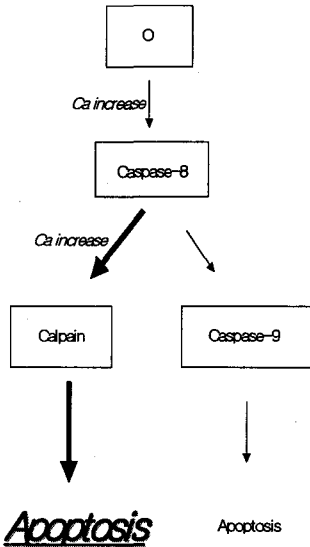


Fig. 8. The scheme for *olibanum*-induced apoptosis pathway in HeLa cells. O: *Olibanum*

IV. 考 察

韓國에서 가장 발생 頻度가 높은 女性 生殖器系 腫瘍인 子宮頸部癌이 上皮 內腫瘍에서 10여 년의 기간을 거쳐 微細浸潤癌으로 발전한다는 사실은 이미 역학적으로 밝혀졌으나 아직까지 각각

의 단계에서의 發癌機轉에 대한 연구는 未洽한 상태이다^{1-6,24)}.

子宮頸部癌을 한의학에서는 '崩漏', '五色帶下', '積聚', '癥瘕', '血蠱' 등의 範疇에서 찾아볼 수 있다. 이 중에서 '崩漏', '五色帶下'는 陰道出血이나 分泌物이 增加하는 경우에, '積聚', '癥瘕', '血蠱' 등은 病期가 어느 정도 進行되어 腫塊의 형태를 이룬 단계로 볼 수 있다. 특히 '癥瘕'는 女性의 生殖器 및 骨盤內腔에 발생하는 腫塊로서 腹中腫塊가 上下로 攻築하고 積塊가 日益增大하여 때로 經閉·切産하며 形瘦不食하고 胸腹飽悶하며 疼痛劇盛하는 症狀을 나타내는 婦人科 疾患이다^{7,9)}.

癥瘕의 原因은 外感寒邪, 七情, 痰, 食積, 死血, 正氣虛 등과 관련되며 그 治法은 일반적으로 破積消瘀血之劑를 주요 藥物로 사용하지만 여기에 養正邪自除의 원리를 적용하여 正氣를 補한 然後에 積塊를 攻破하는 것을 基本 治法으로 하고 또는 初期에는 攻法, 中期에는 攻補兼法, 末期에는 補法으로 치료한다⁹⁾.

乳香은 감람나무과 유향나무 및 同屬 近緣植物의 膠狀樹脂로서 성미는 辛苦溫 無毒하며 心·肝·脾經에 歸經한다. 活血止痛, 通氣化滯, 消腫生肌 등의 效能이 있고 香烈走竄하는 性向이 있어 氣血凝滯, 心腹疼痛, 癰瘡腫毒, 跌打損傷, 癥塊痞積 등에 활용하여왔다¹⁰⁻¹²⁾.

細胞死滅의 한 형태로서 주목을 받고 있는 細胞枯死(apoptosis)는 細胞나 臟器의 恒常性(homeostasis) 유지를 위

한 生物學的 역할로 인식되어 神經系와 免疫系 세포의 生成, 分化 및 機能 發現 등에서 그 중요성이 밝혀지고 있다^{25,26)}.

抗癌治療에 흔히 사용되는 항암제들은 다양한 癌組織이나 細胞柱에서 細胞枯死를 유도하는 것으로 밝혀졌고, 그 작용기전에는 Fas/Fas ligand system, sphingomyelin/ceramide 경로, caspase family cystine protease 및 DNA 분절을 일으키는 endonuclease 등이 관여하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 이유로 抗癌治療의 효율성은 細胞枯死 기전의 活性化와 밀접한 관련이 있으며 腫瘍 治愈의 관점에서 종양세포의 細胞枯死와 관련된 細胞枯死 誘導因子, 信號傳達經路 그리고 關聯 유전자들과 단백질들에 대한 抗癌 機轉의 많은 연구가 이뤄지고 있다²⁷⁻²⁸⁾.

본 실험은 사람의 子宮頸部癌 細胞柱인 HeLa cell을 이용하여 乳香에 의한 細胞枯死 與否와 作用機轉 및 단백질의 발현 與否를 알아보고자 하였다.

세포내 칼슘을 조절하는 機傳은 여러 가지가 있다. 첫째 세포내 망상체 (endoplasmic reticulum: ER)의 Ca-ATPase는 세포내 칼슘을 ER내로 섭취하는 매우 중요한 단백질이다. 둘째 세포막에는 세포막내에 존재하는 Ca-channel (L-type calcium channel)등이 존재하여 濃度 依存的인 칼슘을 흡수하고 있다. 셋째 mitochondria에는 Ca-uniporter가 존재하여 세포내에 많아진 칼슘을 mitochondria로 uptake하여 세포내의 칼슘을 조절하는 기전이 존재한다. 셋째 기전으로 제시한 mitochondria에서의 칼슘의 양적 변화는 세포내 죽음을 결정하는 하나의 중

요한 기전으로 細胞枯死 연구에서 많은 연구가 집중되고 있는 실정이다²⁹⁻³¹⁾.

먼저 HeLa cell에 乳香을 처리시 容量 依存的으로 세포죽음이 야기됨을 확인하였으며, 세포투과성이 있는 calcium chelator인 BAPTA-AM을 처리하여 세포내 증가하는 칼슘을 억제 하였을 때, 세포의 죽음에 대하여 有意性있는 보호 효과를 나타내었다. 반면에 세포에 투과성이 없는 동일 chemical인 BAPTA는 전혀 보호효과를 내지 못했다. 위의 결과로부터 유향으로 인한 칼슘의 量的 增加가 細胞枯死의 주요한 원인임을 알 수 있다(Fig. 1A,B).

세포내 칼슘 저장고인 ER의 Ca-ATPase의 억제제 thapsigargin을 소량 처리하고 24시간 방치하여 ER의 칼슘을 고갈시킨 결과 thapsigargin 처리군이 평균적으로 25% 가량의 보호효과를 나타내었다 (Fig. 2A). 또한 mitochondria의 칼슘 uniporter억제제인 Ru360을 10 혹은 20 uM을 처리하여 mitochondria의 칼슘증가를 억제한 결과 乳香으로 인한 細胞枯死가 有意性있게 보호됨을 알 수 있었다(Fig. 2B).

Stress가 ER내에서 이루어질 때 ER stress 단백질인 GRP78과 GRP94 같은 단백질의 발현이 증가한다¹⁷⁾. GRP78은 cytochrome c가 매개된 caspase activity를 억제함으로써 세포죽음을 억제하기도 하지만 반면에 지속적인 ER stress는 오히려 세포죽음을 야기한다³²⁾.

乳香 처리하여 12, 24, 혹은 36시간 이후 GRP78 발현의 증가를 알 수 있었으나 48시간 이후에는 GRP78의 발현이 감소함을 알 수 있었다. 즉, stress에 적응하고자 하는 특성을 가진다고 알려진

GRP78의 발현이 시약처리 48 시간 이후부터 감소하였다. 이는 stress 지속시간이 길어짐에 따라 세포의 전체적인 형태가 붕괴되어 여러 단백질의 분절이 발생한 것으로 볼 수 있다.

細胞枯死의 誘導 및 調節에는 많은 遺傳子들이 관여하는데, 대표적이 것들이 Bcl-2 family 속하는 Bcl-2, Bax, Mcl-1 遺傳子가 있으며, 그 외에 p53, c-myc 및 APO/Fas 등이 細胞枯死 過程에 관여하는 것으로 알려져 있다³³⁾. Bcl-2 遺傳子는 原癌基因(proto-oncogene)로서 細胞死의 조절에 관여하는 인자로서 다양한 자극에 의해 細胞枯死를 抑制하고³⁴⁾ Pro-apoptotic 단백질로 알려진 Bax 단백질은 Bcl-2 단백질과 heterodimer를 형성하고 있어 상호간에서 서로의 기능을 抑制하고 있다³⁵⁾. 이 실험에서 Bcl-2의 감소와 Bax의 증가를 확인하였으며(Fig. 3A) GRP78은 乳香의 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 3B).

Caspase 가운데 caspase-8 과 caspase-9는 initiator caspase에 속하며, 이는 비교적 upstream의 caspase로 분류되어지고 있다. caspase-9은 mitochondria 경유하는 細胞枯死 經路에 속하며 caspase-8은 receptor 경유하는 經路에 속하고 TNF-alpha, Fas로 인한 細胞枯死에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{21,36-39)}. 따라서 caspase cysteine protease는 細胞枯死의 주요 효소로 그의 活性 확인은 細胞枯死의 주요 기전을 보여줄 수 있으므로 많은 研究에서 시행되어지고 있다.

caspase-3의 活性은 乳香의 농도 의존적으로 증가한데 비하여 caspase-8은 비교적 낮은 농도인 0.5 mg/ml의 乳香

처리시 가장 높은 活性을 보였다. 또한 caspase-9의 活性은 caspase-8 및 3과 비교하여 볼 때 상대적으로 적은 변화를 나타내었으며 낮은 농도에서 비교적 높은 活性을 보였다(Fig. 4A, B, C).

최근에는 caspase 의존적 혹은 비의존적 calpain 관련 apoptosis에 대한 연구가 이루어져 가고 있다. calpain은 칼슘 의존성 cytoplasmic cystine protease로서 信號傳達, 細胞增殖, 細胞 週期の 進行, 分化, 細胞枯死 그리고 細胞膜 融合 등의 과정에 관여한다. Calpain에는 m-calpain과 u-calpain이 있으며 이는 칼슘의 양에 따라 각각 活性化되는 經路가 틀림이 알려져 있다^{19,40)}.

乳香으로 인한 caspase에 대한 연구와 더불어 calpain의 역할에 대한 실험을 실시하여 그 연관성을 알아본 결과 calpain은 caspase-8과 유사하게 비교적 낮은 농도의 乳香 처리시 活性이 강하게 나타났다. 이는 calpain과 caspase-8의 연관을 추정할 수 있는 결과이다(Fig. 5A). 또한 caspase의 活性이 가장 높게 나타나는 시간대인 24시간에 calpain의 活性이 가장 유의하게 증가하였다(Fig. 5B).

앞서 얻은 결과를 총체적으로 입증하기 위하여 caspase-8과 calpain의 억제제가 細胞枯死에 미치는 영향을 알아보았다. caspase-8C/A를 transfection시 乳香으로 인한 細胞枯死은 有意性있게 보호되었으며 또한 calpain 억제제인 calpastatin 처리시에 역시 control 수준으로 억제됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6A). 또한 caspase-8C/A 발현은 calpain을 억제하였으며, calpain 억제 시에는 caspase-8의 영향은 보이지 않았다(Fig.

6B, C). 이는 caspase-8과 calpain의 관련을 보다 분명하게 제시하여주는 결과이다. 즉 caspase-8이 calpain을 조절함을 알 수 있었다.

Caspase-8은 일반적으로 death receptor pathway에서 대표적인 단백질로 type-1과 type-2 세포에 따라서 caspase-8의 활성이 바로 caspase-3로 연결되어지는 경로와 caspase-8의 활성이 caspase-9을 활성화시켜 mitochondria 의존적인 경로를 경유함으로써 세포죽음과 연결되어지는 경로가 있다^{41,42}. 하지만 최근에는 caspase-8의 역할이 새롭게 구성되고 있다. 즉 caspase-8과 calpain의 경로가 그 가운데 대표적인 예로 이 둘의 활성화 연결고리를 칼슘이라고 볼 수 있으며 본 연구에서도 칼슘과 caspase-8 그리고 calpain의 연결되는 기전을 제시하고 있다.

乳香을 처리시 calpain의 증가가 일어났으며 thapsigargin 0.5 uM을 24시간 처리함으로 비슷한 수준의 calpain의 활성 증가가 나타났다. 이 두 가지 약물을 동시에 처리시에는有意性있는 현저한 calpain의 증가가 나타났다(Fig. 7A). 이는 calpain의 증가가 乳香으로 인한 죽음의 핵심적인 역할을 하는 것임을 분명히 제시하는 것이다. 이에 비하여 caspase-8의 경우, 乳香에 의하여 caspase-8의 활성이 증가되지만 thapsigargin에 의하여서는 변동이 없었다. 동시 처리시에도 별다른 변화가 없었다(Fig. 7B). 즉 HeLa cell에 thapsigargin을 처리시 caspase-8의 활성은 일어나지 않으며 calpain의 활성만 증가되었다. 이런 결과로부터 소량의 thapsigargin을 전처리시에는 ER내의 칼

슘이 고갈이 되지만, 일정정도 이상 (1 uM) 처리시에는 오히려 calpain의 증가가 유발되어서 乳香으로 인한 죽음을 보다 강화시킬 수도 있음을 알 수 있었다(Fig. 7C).

乳香으로 인한 細胞枯死의 경로와 관련하여 본 實驗結果를 종합하여 볼 때, 乳香은 먼저 칼슘을 증가시키며, 이를 통한 calpain과 caspase의 활성이 증가되고 그로 인해서 細胞枯死를 유도함을 알 수 있었다(Fig. 8). 한편 caspase-8의 활성화로 인한 caspase-9의 활성은 calpain의 역할보다는 상대적으로 적게 細胞枯死에 영향을 미쳤을 것임을 알 수 있다.

V. 結 論

子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell에서 乳香으로 인한 細胞枯死를 觀察한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 子宮癌 細胞柱인 HeLa cell에 乳香을 처리 시, 용량 의존적으로 細胞枯死가 야기됨을 확인하였다.
2. 乳香으로 인한 HeLa cell의 細胞枯死에서 calcium의 役割을 알아보기 위하여 細胞透過性이 있는 calcium chelator인 BAPTA-AM 및 ER의 Ca-ATPase의 억제제 Thapsigargin 그리고 mitochondria의 칼슘 uniporter억제제인 Ru360을 處理하여 세포내 증가하는 칼슘을 억제하였을 때 有意性있는 保護效果를 나타내었다.
3. 乳香으로 인한 HeLa cell의 細胞枯死에서 Bcl-2의 감소와 Bax의 증가를 확인하였으며, 乳香으로 인한 칼슘의 변화가 세포죽음을 야기하지만 ER stress

marker protein인 GRP78 발현에는 직접적인 영향이 없음을 알 수 있다.

4. 乳香으로 인한 HeLa cell의 細胞枯死에서 caspase-3은 농도의존적으로 活性 증가를 보였다. Caspase-8은 비교적 낮은 농도인 0.5 mg/ml의 乳香 처치시 가장 높은 活性을 보였다.

5. 乳香으로 인한 HeLa cell의 細胞枯死에서 calpain은 caspase-8과 유사하게 비교적 낮은 농도인 0.5 mg/ml과 1mg/ml의 乳香 처치시 活性이 강하게 나타났다. 또한 caspase의 活性이 가장 높게 나타나는 시간대인 24시간에 calpain의 活性도 가장 유의하게 증가하였다.

6. 乳香으로 인한 HeLa cell의 細胞枯死에서 caspase-8과 calpain 억제시 細胞枯死는 有意性있게 보호되었으며, caspase-8C/A 발현은 calpain을 억제하였으며, calpain 억제시에는 caspase-8의 영향은 보이지 않았다. 즉 caspase-8이 calpain을 조절함을 알 수 있었다.

7. 乳香으로 인한 HeLa cell의 細胞枯死에서 乳香(0.5, 1 mg)을 처리시 calpain의 活性 증가가 일어났으며 thapsigargin 0.5 uM을 24시간 처치함으로 비슷한 수준의 calpain의 活性 증가가 나타났다. 이 두 가지 약물을 동시에 처리시에는 有意性있는 현저한 calpain의 증가가 나타났다. caspase-8의 경우, 乳香에 의하여 caspase-8의 活性이 증가되지만 thapsigargin에 의하여서는 변동이 없었다. 동시 처리시에도 별다른 변화가 없었다.

8. 乳香으로 인한 HeLa cell의 細胞枯死에서 乳香은 먼저 칼슘을 증가시키며, 이를 통한 calpain과 caspase의 活性이

증가되고 그로 인해서 細胞枯死를 유도함으로써 항암제로서의 가능성을 제시하여 주었다.

以上の 實驗結果로 볼 때 乳香은 子宮頸部癌細胞柱인 HeLa cell의 細胞枯死를 誘導하였으며, 乳香으로 인한 세포죽음은 세포내 칼슘의 증가와 calpain과 caspase-8 및 3의 活性이 주요한 經路로 나타나고 있다.

□ 투 고 일 : 2006년 04월 28일

□ 심 사 일 : 2006년 05월 01일

□ 심사완료일 : 2006년 05월 09일

參考文獻

1. 韓醫婦人科學 教材編纂委員會, 韓醫婦人科學(상), 서울: 정담, 2001;319-26.
2. 이승호, 子宮頸部癌의 역학과 병인론, 啓明醫大論文集, 1997;16(1);29-36.
3. 대한산부인과학회 교과서편찬위원회, 부인과과학, 서울: 칼빈출판사, 1997;980-1027.
4. 조종관, 한방임상중양학, 대전: 주민출판사, 2001;799-818.
5. 최승훈, 東醫腫瘍學, 서울:杏林出版, 1995;229-234.
6. 문구, 김병주, 정병학, 癌東西醫結合治療, 益山: 圓光大學校出版局, 1999;379-406.
7. 宋炳基, 韓方婦人科學, 서울: 癸丑文化社, 1992;249-57.
8. 李鍾華, 韓方婦人科 臨床診療, 서울: 癸丑文化社, 1982;264,274.
9. 李熙祥, 鄭鎮鴻, 柳同烈, 癥瘕의 治方에 對한 文獻的 考察, 大田大學校 韓醫學

- 研究所 論文集, 1998;6(2);417-35.
10. 辛民教, 臨床本草學, 서울: 永林社, 1997;729-31.
 11. 康秉秀 등, 본초학, 서울: 永林社, 2000;410-1.
 12. 辛民教 등, 2000본초방제학연구, 서울: 永林社, 2000;347-8.
 13. 한상헌 등, 우향추출물이 MC3T3-E1 세포 활성 및 분화에 미치는 영향, 대한치주과학회지, 2001;30(2):287-98.
 14. 문형철 등, 노간주나무와 유향나무의 초임계 공법으로 추출한 정유의 면역 활성 비교, 한국약용작물학회지, 2004;12(3):243-8.
 15. Clapham DE, Intracellular calcium, Replenishing the stores, Nature, 1995;375: 634-5.
 16. Bygrave FL, Roberts HR, Regulation of cellular calcium through signaling cross-talk involves an intricate interplay between the actions of receptors, G-proteins, and second messengers, FASEB J, 1995;9(13):1297-303.
 17. Hayashi T, et al, Induction of GRP78 by ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and prevents delayed neuronal cell death, J Cereb Blood Flow Metab, 2003;23(8):949-61.
 18. Liu X, Van Vleet T, Schnellmann RG, The role of calpain in oncotic cell death, Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2004;44:349-70.
 19. Goll DE, et al, The calpain system, Physiol Rev, 2003;83(3):731-801.
 20. Ray SK, Banik NL, calpain and its involvement in the pathophysiology of CNS injuries and diseases: therapeutic potential of calpain inhibitors for prevention of neurodegeneration, Curr Drug targets CNS Neurol Disord, 2003;2(3):173-89.
 21. Cryns V, Yuan Y, Proteases to die for, Genes Dev, 1998;12(11):1551-70.
 22. Danial NN, Korsmeyer SJ, Cell death: Critical Control Points, Cell, 2004;116: 205-19.
 23. Bidere N, Senik A, Caspase-independent apoptotic pathways in T lymphocytes: A minireview, Apoptosis, 2001;6:371-5.
 24. 최규연 등, 子宮頸部癌의 발암과정에서 아포토시스의 역할, 대한부인종양콜포스키회학회지 1997;8(3):250-7.
 25. Williams GT, Apoptosis in the immune system, J Pathol, 1994;173:1-4.
 26. Raff MC, et al, Programmed cell death and the control of cell survival, Science 1993;262:695-700.
 27. Mesner P, Budihardjo I, Kaufmann SH, Chemotherapy-induced apoptosis, Adv Pharmacol, 1997;41:461.
 28. Scott HK, William CE, Induction of apoptosis by cancer chemotherapy, Experimental Cell Research, 2000;256:42-9.
 29. Berridge MJ, LiP, Bootman MD, The versatility and universality of calcium signalling, Nat Rev Mol Cell Biol, 2000;1(1):11-21.
 30. Smaili SS, et al, Mitochondria in Ca⁺⁺ signaling and apoptosis, J Bioenerg Biomembr, 2000;32(1):35-46.
 31. Berridge MJ, The endoplasmic reticu

- lum: a multifunctional signaling organelle, *Cell Calcium* 2002;32:235-49.
32. Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE, Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program, *Cell Death Differ*, 2004;11(4):372-80.
33. 이규완 등, 자궁경부 상피내 종양 및 子宮頸部癌 조직에서 p53, MIB-1, 및 세포고사(apoptosis)에 관한 연구, 대한산부인과학회지, 2001;44(6):1115-22.
34. Reed JC, Bcl-2 and the regulation of programmed cell death, *J Cell Biol*, 1994;124:1-6.
35. Oltvai Z, Milliman C, Korsmeyer SJ, bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death, *Cell*, 1993;74:609-19.
36. Ashkenazi A, Dixit VM, Death receptors: signaling and modulation, *Science*, 1998;281:1305-8.
37. Brenner C, Kroemer G, Apoptosis, Mitochondria-the death signal integrators, *Science*, 2000;289:1150-1.
38. Thornberry N, Lazebnik Y, Caspases: enemies within, *Science*, 1998;281:1312-6.
39. Green DR, Reed JC, Mitochondria and apoptosis, *Science*, 1998;281:1039-312.
40. Suzuki K, et al, Structure, activation, and biology of calpain, *Diabetes*, 2004;53:12-8.
41. Srivastava RK, TRAIL/Apo-2L: mechanisms and clinical applications in cancer, *Neoplasia*, 2001;3(6):535-46.
42. Wang J, Lenardo MJ, Roles of caspases in apoptosis, development, and cytokine maturation revealed by homozygous gene deficiencies, *J Cell Sci*, 2000;113(Pt5):753-7.